پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد۱۰ شمارهٔ۱، نیمهٔ اوّل ۱۳۹۸، صفحهٔ ۱۰۲-۹۱
نوع مقاله: پژوهشی

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 10, No. 1, 2019, p. 91-102 (Research Article)
DOI: 10.22067/ijpr.v10i1.60228

بررسی بیان موقت پروتئین نوترکیب CCL21 انسانی در گیاه نخود به روش آگروانفیلتراسیون

ماریا بیهقی[۱]، عبدالرضا باقری[۲*]، حسن مرعشی[۳]، مجتبی سنکیان[۴] و افسانه سادات فرساد[۵]

۱- عضو هیئت علمی (استادیار) مؤسسه آموزش عالی کاویان، گروه زیست‌شناسی، مشهد، mariabeihaghi@kavian.ac.ir

۲- استاد گروه بیوتکنولوژی و بِه‌نژادی گیاهان زراعی دانشکدهٔ کشاورزی و عضو هیئت علمی پیوستهٔ گروه بقولات پژوهشکدهٔ علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استاد گروه بیوتکنولوژی و بِه‌نژادی گیاهان زراعی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد ، marashi@um.ac.ir

۴- استادیار پزشکی رشتهٔ ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، sankianm@mums.ac.ir
پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

۵- استادیار بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، farsadafsaneh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۱۴

چکیده

کموکاین CCL21 از جمله کموکاین‌هایی است که خاصیت آنتی‌توموری دارد و در ایمونوتراپی بر پایه سیتوکنین‌ها بر علیه سلول‌های سرطانی مؤثر می‌باشد. با توجه به اهمیت فناوری جدید تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان، تولید پروتئین CCL21 نیز در گیاه نخود که دارای خواص آنتی‌توموری و ترکیبات معدنی و شیمیایی مناسب است، مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه حاضر از بیان موقت پروتئین CCL21 به روش آگروانفیلتراسیون، برای تولید این پروتئین نوترکیب در گیاه نخود استفاده شده است. ۷۲ساعت بعد از آگروانفیلتراسیون، نتایج آزمون‌های RT-PCR، Real time PCR، دات‌بلات، وسترن‌بلات و الایزا نشان داد که سازه ژنی طراحی شده در برگ‌های نخود با میزان بالایی در سطح رونویسی و ترجمه بیان شده است. بنابراین با استفاده از روش آگروانفیلتراسیون و انتقال سازه بیانی CCL21، نتایج نشان داد که نخود می‌تواند گیاه مناسبی جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب باشد.

کلمات کلیدی: آگروانفیلتراسیون، پروتئین نوترکیب، ژن *ccl21* ، نخود

مقدمه

گیاهان تراریخته بهترین میزبان جهت بیان صحیح پروتئین‌های نوترکیب به حساب می‌آیند، زیرا منجر به تولید ارزان آنتی‌ژن‌ها و پروتئین‌های نوترکیبی می‌شوند که به‌عنوان واکسن تزریقی و در حالتی ایده‌آل‌تر به صورت خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kim & Yang, 2010). در حال حاضر گیاهانی با ارزش غذایی بالا، به عنوان سیستم بیانی استفاده می شوند، بعضی از آنها را می‌توان به صورت خام مصرف کرد که نیاز به پردازش و تخلیص را حذف می‌کند. بیان آنتی‌ژن‌های واکسن در گیاهانی مثل سیب، موز، گوجه‌فرنگی، آووکادو، بادام زمینی، ذرت، سویا و نخود (دانه) گزارش شده است (Mehrotra *et al.*,2011; Yajun *et al.*, 2012).

انتقال ژن به کمک *آگروباکتریوم تومفاشینس* و تفنگ ژنی روش‌های مرسوم تولید گیاهان تراریخته می‌باشند. بر اساس الگوی بیان ژن، دو روش بیان پایدار و موقت وجود دارد. در بیان پایدار باید شرایط کشت بافت و باززایی گونه گیاهی بهینه‌شده باشد، لذا دستیابی به گیاهان تراریخت با بیان پایدار زمان‌بر می‌باشد (Obeme *et al.*, 2011; Koprowski & Yusibov, 2001). از طرف دیگر با توجه به مشکلات تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخته پایدار از جمله خاموشی ژن پس از انتقال، تغییرات نامطلوب در ترکیب کربوهیدرات‌های مرکب و بزرگ قندی، وقت گیربودن تولید یک رده گیاهان تراریخته پایدار با قابلیت تولید مطلوب پروتئین و مهم‌تر از همه مشکلات زیست‌محیطی و احتمال فرار ژن و خطرات ناشی از آن سبب شده است که در سال‌های اخیر از روش‌های بیان موقت ژن در گیاه به عنوان روش های مناسب برای تولید فرآورده‌های نوترکیب استفاده شود (Wang & Ma, 2012). از دو روش آگروانفیلتراسیون و آلودگی با ویروس‌های گیاهی برای بیان موقت ژن‌های خارجی استفاده می‌شود. اگرچه ناقل‌های ویروسی به دلیل آلودگی سیستمیک امکان تولید بالای مقادیر پروتئین نوترکیب را ایجاد می‌کنند، اما محدودیت در بیان ژن‌هایی با اندازه بزرگ و نگرانی‌های زیست محیطی سبب کاهش کاربرد آن‌ها شده است (Fischer *et al.*, 2004).

---

*نویسنده مسئول: abagheri@ferdowsi.um.ac.ir

سرطان، سومین عامل مرگ‌ومیر در ایران است. واکسن‌هایی که به منظور درمان سرطان ساخته شده‌اند، شامل واکسن‌های درمانی و واکسن‌های پیشگیری‌کننده می‌باشند. در مورد واکسن های نوترکیب گیاهی برای درمان سرطان، تاکنون تعداد معدودی در مرحله آزمایشگاهی در حال بررسی می‌باشند. پژوهشگران یک واکسن سرطانی با پایه گیاهی تهیه کرده‌اند که می‌تواند واکنش ایمنی بدن را فعال کرده و براساس نوع خاص تومور یک بیمار ساخته شود و در واقع با تهیه این واکسن به درمان سرطان بدون ایجاد عوارض جانبی دست یافته‌اند (Lollini *et al.*, 2006). همچنین از ضدتومورهایی مانند وین‌بلاستین و وین‌کرستین و آلکالوئیدهایی که از گیاه کاتارانتوس روزئوس (پریوش) به‌دست می‌آیند، در درمان سرطان خون استفاده شده است (Sain & Shema, 2013). علاوه براین پژوهشگران دریافتند پادتن ضدسرطان در دانه گندم و برنج قادر به تشخیص سلول‌های سرطان ریه، سینه و روده بزرگ می‌باشد و نیز در آینده برای تشخیص درمان سرطان سودمند است (Watson *et al.*, 2014).

یک روش جدید برای ایمونوتراپی در درمان سرطان، واکسیناسیون ژن‌های سیتوکنینی به صورت زیرپوستی می‌باشد که باعث افزایش ایمنی بدن در مقابل سرطان شده و در نتیجه سلول‌های سرطانی از بین رفته و سلول‌های سالم باقی می‌مانند. کموکاین CCL21[1] از جمله کموکاین‌هایی است که خاصیت آنتی‌توموری دارد و در ایمونوتراپی بر پایه سیتوکنین‌ها بر علیه سلول‌های سرطانی مؤثر می‌باشد (Ding *et al.*, 2003). CCL21 در بافت‌های لنفی مختلفی بیان می‌شود و به گیرنده CCR7 بر روی سلول‌های دندرتیک متصل می‌شود. این گیرنده در مهاجرت لنفوسیت‌ها به اندام‌های لنفی و نیز در خروج سلول‌های T از بافت‌های بیرونی و محیطی اعصاب به غده‌های لنفی و بالغ شدن سلول‌های دندرتیک نقش دارد (Sain & Shema, 2013). واکسن سرطانCCL21 که تشکیل شده از سلول‌های دندرتیک به همراه پلاسمید آدنوویروس حامل ژن *ccl21*، دارای یک ایمنی بالقوه با فعالیت ضدسرطانی است (Mantovani *et al.*, 2006). مکانیزم عمل آن به این صورت است که پس از جایگیری تومورها در درون سلول‌ها، واکسن آدنوCCL21، کموکاینCCL21 را بیان می‌کند که پاسخ ایمنی سیتوکنینی آنتی‌توموری را در محیط القاء خواهد کرد (Lu *et al.*, 2016).

گیاه نخود به علت خواص فراوان دارای ارزش غذایی بالایی بوده و در درمان سرطان مؤثر می‌باشد. ترکیبات معدنی مناسب از جمله سلنیوم به عنوان کوفاکتور آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز باعث شده تا این گیاه به عنوان یک گیاه ضدسرطان محسوب شود. این ترکیب نقش مؤثری در عملکرد آنزیم‌های کبدی ایفا می‌کند و به سم‌زدایی برخی از ترکیبات سرطان‌زا در بدن کمک می‌کند و علاوه بر این، سلنیوم مانع از التهاب و نیز کاهش رشد تومور می‌شود. همچنین گیاه نخود حاوی فولات می‌باشد که نقش مهمی در سنتز و ترمیم DNA ایفا کرده و در نتیجه موجب ممانعت از تشکیل سلول‌های سرطانی ناشی از جهش در DNA می‌شود. علاوه بر این ساپونین‌ها، از جمله مواد شیمیایی گیاهی موجود در نخود هستند که از تکثیر و گسترش سلول‌های سرطانی در سراسر بدن جلوگیری می‌کنند. همچنین مصرف فیبر بالا در میوه‌ها و سبزیجاتی مانند نخود با کاهش خطر سرطان روده بزرگ مرتبط می‌باشد. گیاه نخود حاوی ویتامینC است که به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی عمل می‌کند و باعث محافظت از سلول‌های بدن در برابر رادیکال‌های آزاد می‌شود (Ware, 2016). تاکنون بیان ژن‌های مختلف از طریق اگروانفیلتراسیون در نخود گزارش شده است (Fontana *et al.*,1993; Krishnamurthy *et al.*, 2000, Shivani *et al.*, 2010).

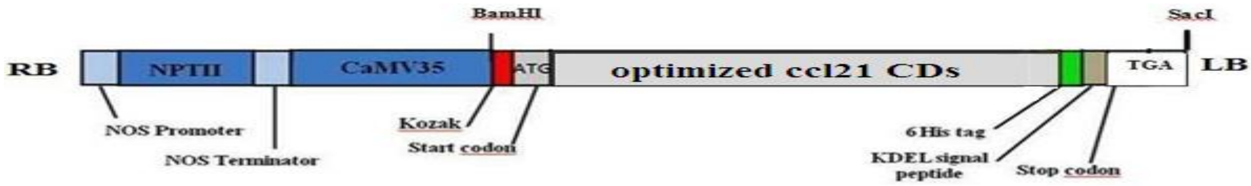
در این پروژه نیز با توجه به جایگاه باارزش پروتئین نوترکیبCCL21 در فعالیت آنتی‌توموری بیماران مبتلا به سرطان، بیان موقت ژن *ccl21* در گیاه نخود با روش آگروانفیلتراسیون صورت گرفت و میزان بیان آن در سطح رونویسی و ترجمه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

بهینه‌سازی توالی ترانسژن و طراحی سازه بیان

جهت افزایش میزان بیان ژن *ccl21* در باکتری و گیاه، سازه ژنی به‌صورت مصنوعی طراحی و ساخته شد. توالی ابتدایی این ژن ۱۱۴۶جفت باز می‌باشد. پس از حذف توالی‌های اینترون و توالی مربوط به سیگنال پپتید که در ابتدای ژن قرار داشت، توالی مربوط به کدون آغازگر (AUG) و به منظور دستیابی به بیان بالا در سیستم گیاهی، توالی افزایش‌دهنده بیانی (Kozak sequence) به انتهای ۵ به عنوان جایگاه اتصال ریبوزوم اضافه شد (Kozak, 1989). سپس توالی نشانه SEKEDEL و توالی تگ هیستیدین (۶xHis) به انتهای ۳ ژن افزوده گردید (Wandeltt *et al.*, 1992). برای تعیین توالی کوزاک از توالی‌های قبل از کدون شروع، در ژن‌هایی با بیان بالا در گیاهان استفاده گردید (Wang, 2004). از توالی نشانه SEKEDEL که به عنوان یک سیگنال پپتید برای شبکه آندوپلاسمی عمل می‌کند، جهت کمک به پیچش و تولید بهتر پروتئین استفاده شده است و هدف از افزودن تگ پلی هیستیدین کمک به تخلیص پروتئین در مراحل نهایی می‌باشد.

[1] Chemokine C-C motif ligand 21



شکل ۱- پلاسمید ناقل دوگانه pBI121 حاوی ژن *ccl21*، Nos Promoter: نواحی پیشبر ژن نوپالین سنتاز؛ NPTII: ژن نئومایسین فسفوترانسفراز که موجب مقاومت به کانامایسین می شود؛ Nos Terminator: پایانبر ژن نوپالین سنتاز؛ CaMV35: پروموتور ویروس موزائیک گل کلم؛ sequence KOZAK: توالی افزایش‌دهنده بیانی کوزاک (GCAACA)؛ 6His tag: تگ هیستیدین؛ TGA: کدون خاتمه؛ RB و LB: توالی های مرزی راست و چپ

Fig. 1. pBI121 binary vector harboring *ccl21*, Nos Promoter: Nopaline synthase Promotor; NPTII: Neomycin phosphotransferase gene which confers kanamycin resistance; Nos Terminator: Nopaline synthase Terminator; CaMV35: Cauliflower mosaic virus promoter; KOZAK sequence: The sequence (GCAACA) that increases the gene expression level; 6His tag: Histidine Tag; TGA: Stop codon. RB & LB: Right & Left Borders

ساخت سازه بیانی

با قراردادن دو سایت برشی در دو سوی توالی مورد نظر، با استفاده از دو آنزیم برشی *BamH*I و *Sac*I پلاسمید pGH حاوی ژن مورد نظر و پلاسمید pBI121 برش داده شدند و این هضم مضاعف موجب جداشدن قطعه GUS از پلاسمید pBI121 و جداشدن *ccl21* از pGH گردید. پس از انجام هضم، خروج GUS و خطی‌شدن پلاسمید، واکنش اتصال (ligation) توسط آنزیم آنزیم T4 DNA Ligase انجام شد (شکل۲). سازه‌های ساخته‌شده توسط PCR با آغازگرهای ویژه ژنی که در جدول ۱ آورده شده است، مورد تأیید قرار گرفتند. سپس در طی فرایند اتصال سازه ژنی موردنظر در ناقل دوگانه بیان گیاهی PBI121 درج گردید. به این ترتیب سازه ژنی حاصله، حاوی تمامی عناصر و توالی‌های لازم برای افزایش بازدهی بیان ژن شامل یک پیشبر قوی (پروموتور 35S)، توالی خاتمه‌دهنده (خاتمه‌دهنده nos) و ژن نشانگر گزینشگر (ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک) بود.

تهیه مایه تلقیح و انجام آگرواینفیلتراسیون

از هرکدام از کلنی‌های آگروباکتریوم سویه GV3101 حاوی پلاسمید نوترکیب که با استفاده از روش شوک و حرارت تراریخته شدند، یک کلنی برداشته شد و به مدت ۴۸ساعت در محیط LB حاوی ۵۰میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۵۰میلی‌گرم در لیتر ریفامپسین داده شد. پس از رسیدن غلظت محیط کشت به OD600=۱/۵، سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ شده و پس از حذف سوپرناتانت، پلیت باکتریایی در محیط اینفیلتراسیون (محیط کشت LB مایع حاوی MgSO4 ۱۰میلی‌مولار، MES ۱۰میلی‌مولار (2-morpholin-4-ylethanesulfonic acid و استوسرینگون ۱۵۰میکرومولار) معلق شده و تراکم سلولی در OD600= ۰/۵ تنظیم شد. سپس سوسپانسیون حاصله به مدت ۱۲۰دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. برای انتقال سوسپانسیون اگروباکتریوم به برگ نخود ابتدا زخم بر روی سطح برگ ایجاد شد و سپس از سرنگ فاقد سوزن استفاده شد (Hashemi *et al.*, 2006; Habibi *et al.*, 2014). آنالیز بیان ژن سه روز پس از انتقال باکتری به گیاه شروع شد (Simmons *et al.*, 2009).

استخراج RNA، RT PCR و Real time PCR

بعد از گذشت ۷۲ساعت از آگرواینفیلتراسیون،RNA کل با استفاده از کیت شرکت پارس توس Cat. No A101231 استخراج شد و بعد از تیمار DNase، رشته مکمل cDNA با استفاده از یک آغازگر الیگو dT (۲۰ نوکلئوتیدی) پارس توس ساخته شد (Cat.No C101131). آزمایش RT-PCR با آغازگرهای ویژه *ccl21* و ژن خانه دار ubiquitin صورت گرفت. مقادیر Ct با نرم‌افزار Bio-Rad CFX Manager به دست آمد و سطح نسبی بیان ژن در مقادیر $2^{-\Delta\Delta Ct}$ با روش لیواک و اشمیتگن (Livak & Schmittgen, 2001) محاسبه شد.

استخراج پروتئین

۰/۱گرم از برگ‌های تلقیح‌شده با اگروباکتریوم، در نیتروژن مایع پودر شد و بعد از اضافه‌کردن ۸۰۰میکرولیتر بافر استخراج (حاوی ۵۰میلی‌مولار Tris-HCl(pH=۸)، ۲ میلی مولار EDTA(pH=۸) ، ۰/۵مولار NaCl و یک میلی‌مولار dithiothreitol (DTT)) و سانتریفیوژ به مدت ۲۰دقیقه در g ۱۲۰۰۰، روشناور جدا و بر اساس روش Bradford (1976) غلظت پروتئین کل اندازه‌گیری شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای آزمون PCRو Real time PCR

Table 1. Oligonucleotide primers used to PCR and Real time PCR

ژن **Gene**	آغازگر پیشرو **Forward Primer**	آغازگر پسرو **Riverse Primer**
**CaMV-ccl21*	5´ GATGACGCACAATCCCACT 3´	5´ CCCTTTCCCTTCTTTCCA 3´
***ccl21*	5´ GGGTTCAACAACTTATGC 3´	5 CTTTCCCTTCTTTCCAGT 3´
****ubiquitin*	5´ CACGGTTCAACAACATCCAG 3´	5´ TGAAGACCCTGACTGGGAAG3´
***** nptII*	5´ CACGGTTCAACAACATCCAG 3´	5´ TGAAGACCCTGACTGGGAAG3´

* آغازگر مورد استفاده برای تأیید سازه‌های ژنی (محصول PCR، ۳۸۵ جفت باز)
** آغازگر مورد استفاده برای بررسی‌های Real time PCR(محصول PCR، ۱۰۳ جفت باز)
***یوبی‌کوییتین، ژن استاندارد داخلی برای مقایسه سطح رونوشت‌برداری ژن *ccl21* بیان‌شده
**** اغازگر مورد استفاده برای بررسی حضور سازه ژنی در ناقل PBI121 (محصول PCR ، ۷۹۸ جفت باز)

* primers used to verify gene constructs (PCR product: 385 bp)
** primers used for Real time PCR assey (PCR product: 103 bp)
*** Internal standard gene for comparison of *ccl21* gene transcription level
**** primers used to verify gene constructs into pBI121 vector (PCR product: 798 bp)

آزمون دات بلات

ابتدا دو میکرولیتر از پروتئین روی غشای نقطه‌گذاری شده و غشاء در ۳۷درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا خشک گردد. سپس غشاء به مدت یک‌ساعت با محلول بلوکه‌کننده (BSA) انکوبه شد. محلول بلوکه‌کننده مانع از انجام واکنش‌های غیراختصاصی می‌شود. سپس غشاء به مدت یک‌ساعت با آنتی‌بادی پلی هیستیدین کونژوگه انکوبه شده (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) و سه مرتبه با PBST/PBS شستشو داده شد. سپس غشاء با سوبسترای DAB[۱] انکوبه شد. دو میکرولیتر از پروتئین CCL21 تجاری به عنوان کنترل مثبت و حجم مشابهی از پروتئین گیاه غیرتراریخته به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون SDS-PAGE و وسترن بلات

آزمایش SDS-PAGE روی ژل ۱۵درصد با ۱۵میکروگرم پروتئین کل و رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو صورت گرفت (Farsad *et al.*, 2016). جهت وسترن بلاتینگ ژل به غشاء نیتروسلولزی منتقل شد و با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال تگ هیستیدین کونژوگه و سوبسترای DAB رنگ‌آمیزی گردید (Farsad *et al.*, 2016) (شکل۷).

آزمون الایزا

در نهایت میزان جذب پروتئین نوترکیب در برگ‌های تلقیح‌شده با تکنیک الایزا تعیین شد (Shoji *et al.*, 2009)، به این ترتیب که ۱۰۰میکرولیتر از عصاره پروتئینی در هر چاهک پلیت الایزا ریخته شد. ۱۰۰میکرولیتر از واکسن معمولی تب برفکی به عنوان کنترل مثبت، پروتئین استخراج شده از گیاهان غیرتراریخته و همین‌طور محلول BSA به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از پوشش‌دادن پلیت الایزا با آنتی‌ژن و استفاده از آنتی‌بادی پلی هیستیدین کونژوگه و سوبسترای TMB[۲]، جذبOD[۳] در ۴۵۰نانومتر در سه تکرار قرائت شد.

نتایج و بحث

در این مطالعه به منظور واردنمودن توالی سازه ژن مورد نظر به درون ناقل بیانی دوگانه pBI121 ، واکنش هضم مضاعف انجام شد (شکل۲).

به منظور بررسی بیان ژن *ccl21* در نخود به عنوان میزبان از روش آگروانفیلتراسیون استفاده شد. پس از همسانه سازی ژن *ccl21* در ناقل بیانی pBI121، کلونی‌های به‌دست آمده توسط آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای ویژه ژنی که در جدول ۱ عنوان شده‌اند، تأیید گردید (شکل ۳).

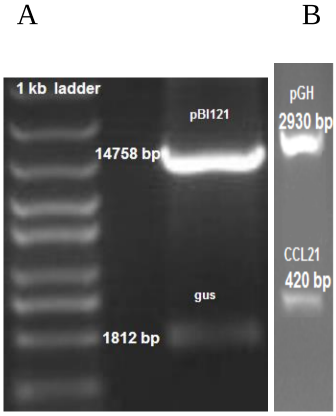
بررسی بیان ژن *ccl21* در سطح RNA

با تکثیر قطعه ۳۸۶جفت بازی مربوط به ناحیه پیشرو پلاسمید که قسمتی از پروموتور 35S و ناحیه‌ای از ژن *ccl21* می‌باشد و نیز تکثیر قطعه ۷۹۸جفت بازی مربوط به پرایمر *nptII* حضور قطعه مورد نظر در ژنوم نخود تأیید گردید (شکل۴). همچنین تکثیر قطعه ۱۰۳جفت بازی cDNA حاصل از mRNA نمونه‌های اینفیلتره‌شده در آزمون RT PCR، رونوشت‌برداری از ژن *ccl21* را اثبات نمود (شکل ۵A). از ژن *ubiquitin* نیز به عنوان ژن کنترل داخلی جهت کمی نمودن و یکسان‌سازی غلظت‌های cDNA در برگ‌های اینفیلترشده استفاده گردید و در نهایت همان‌طورکه در شکل ۵B نشان داده شده است قطعه ۱۰۵جفت بازی تکثیر گردید.

[۱] Di-aminobenzidine

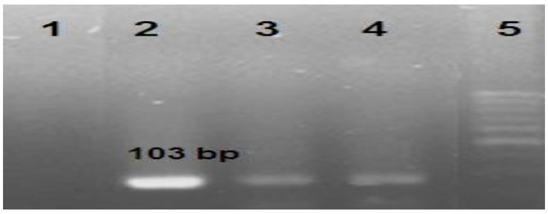
[۲] 3,3,5,5′-Tetramethylbenzidine

[۳] Optical dencity



شکل ۲- واکنش هضم پلاسمید؛ A: PBI121 حاوی ژن *gus* و B: pGH حاوی ژن *ccl21* و استفاده از آنزیم برشی *BamH* I و *Sac* I

Fig. 2. Digestion of pGH plasmid containing the *ccl21* gene and PBI121 plasmid containing the *gus* gene with *BamH* I and *Sac* I restriction enzyme.



شکل۳- تأیید کلنی‌های اگروباکتریوم نوترکیب واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *ccl21* جهت تکثیر قطعه ۱۰۳جفت بازی، ۱: شاهد منفی (NT)؛ ۲،۳و۴: کلنی‌های مثبت حاوی ژن *ccl21*؛ ۵: نشانگر مولکولی شرکت پارس توس

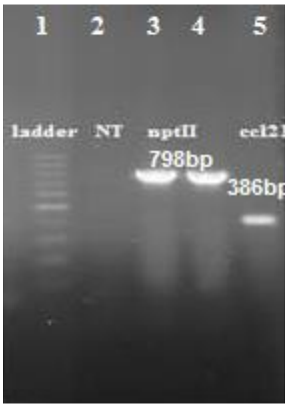
Fig. 3. Verification of recombinant Agrobacterium colonies with PCR by *ccl21* primers, 1: Negative Control (NT); 2,3,4: clonies that has *ccl21* gene; 5: Molecular Marker with Pars Tous

نتایج آزمون Real Time PCR با استفاده از آغازگرهای ژن مورد نظر و ژن کنترل داخلی نشان داد که مبین بیان معنی دار ژن ccl21 در بافت‌های گیاهی تلقیح‌شده با آگروباکتریوم بود. (شکل ۶).

بررسی بیان ژن *ccl21* در سطح پروتئین

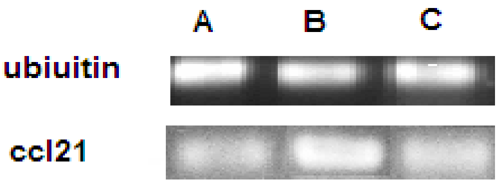
افزایش رونوشت‌های mRNA یک ژن الزاماً نمی‌تواند منجر به سطوح بالای بیان آن پروتئین گردد، زیرا تنها حدود ۴۰-۲۰ درصد فراوانی پروتئین با غلظت mRNA قابل تعیین است (Nie *et al.*, 2006) و غلظت نهایی پروتئین‌ها، به سرعت ترجمه و تجزیه نیز بستگی دارد. بنابراین، جهت بررسی بیان ژن در سطح پروتئین، از آزمون‌های وسترن بلات، دات بلات و الایزا استفاده شد. نتایج آزمون SDS-PAGE حضور باند ۱۵/۵کیلو دالتونی مربوط به پروتئین CCL21 را مورد تأیید قرار داد (شکلA ۷). آزمون وسترن بلات هم توسط آنتی‌بادی مونوکلونال کونژوگه پلی هیستیدین (شرکت Sigma) انجام شد. وزن مولکولی پروتئین توسط وسترن بلات، ۱۵/۵کیلودالتون تشخیص داده شد که دلیلی بر بیان موفق این پروتئین در گیاه نخود می‌باشد (شکلB ۷). همان‌طورکه در شکل ۸A نشان داده شده است، سیگنال مثبتی در محل لکه گذاری پروتئین برگ گیاه تلقیح‌شده دیده می‌شود؛ در حالی که در لکه مربوط به پروتئین گیاه وحشی هیچ سیگنال مشخصی دیده نمی‌شود. این نتایج حاکی از تولید صحیح پروتئین نوترکیب CCL21 در برگ گیاه نخود از طریق بیان موقت است.

نتایج آزمون الایزا نیز با استفاده از آنتی‌بادی پلی هیستیدین کونژوگه نشان داد که پروتئین نوترکیب CCL21 در برگ گیاه اینفیلتره‌شده نخود به‌خوبی بیان شده است (شکلB ۸). در این جا نیز نمونه‌هایی از گیاه تیمارشده، گیاه تیپ وحشی (کنترل منفی) و کنترل مثبت برای مقایسه نتایج استفاده شد. همان‌طورکه در شکل ۸B دیده می‌شود، میزان بیان ژن در نمونه‌ی تلقیح‌شده بسیار بیشتر از گیاه تیپ وحشی بود که حاکی از بیش بیان CCL21 در برگ‌های تلقیح‌شده نخود می‌باشد. واکنش ناچیزی که در گیاه تیپ وحشی و Blank دیده می‌شود، به نظر می‌رسد ناشی از واکنش‌های غیراختصاصی در چاهک الایزا باشد.



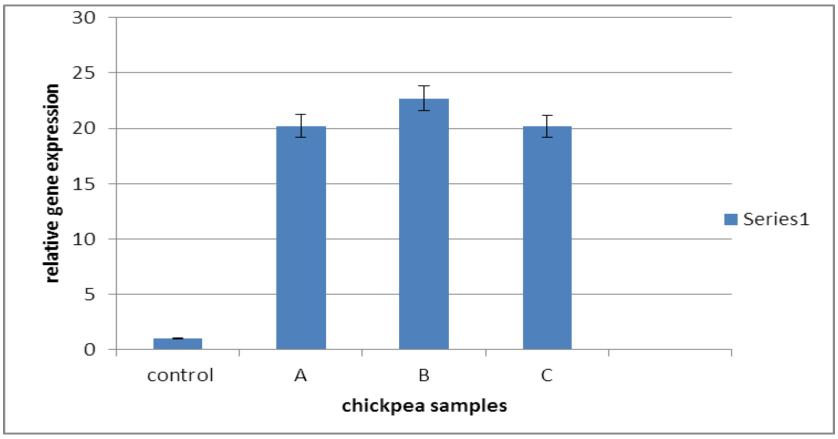
شکل ۴- تأیید حضور ترانسژن با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در نمونه‌های اینفیلتره‌شده گیاه نخود، ۱: نشانگر مولکولی شرکت پارس توس؛ ۲: شاهد منفی نمونه DNA استخراج‌شده از برگ نخود تلقیح نشده(NT)؛ ۳ و ۴: تأیید حضور ژن با استفاده از آغازگرهای ژن مقاومت به کانامایسین (*nptII*) (تکثیر قطعه ۷۹۸جفت بازی)؛ ۵: تأیید حضور ژن با استفاده از آغازگرهای CaMV-CCl21 (تکثیر قطعه ۳۸۶ جفت بازی)

Fig. 4. PCR analysis for detection of *ccl21* gene in infiltrated leaves of chickpea, 1: 100bp Size marker (parstous); 2: PCR product of wild type plant ((NT); 3 & 4: PCR products of infiltrated plant by *nptII* primers (798 bp); 5: PCR product of infiltrated leaves by CaMV-CCl21primers (386 bp)



شکل ۵ – بررسی بیان ژن *ccl21*، (A): تأیید بیان *ccl21* در برگ‌های اینفیلترشده گیاه نخود با روش مقایسه نیمه کمیRT-PCR، (B): تکثیر ژن *ubiqutin* نخود به عنوان ژن کنترل داخلی

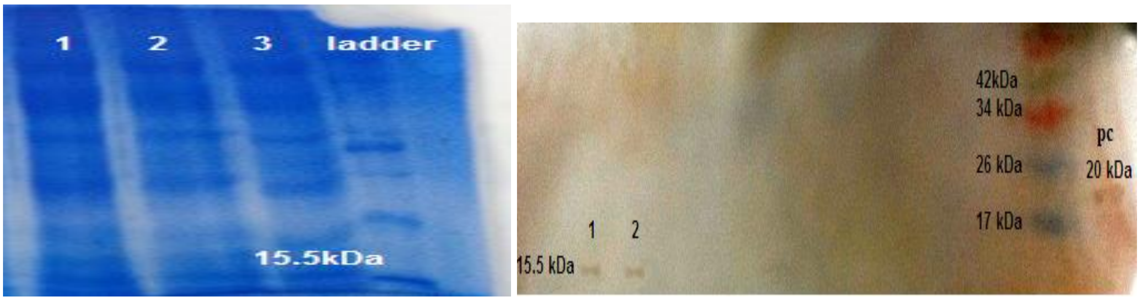
Fig. 5. *ccl21* gene expression assessment, (A): Verification of *ccl21* expression in chickpea of infiltrated leaves with semi quantitative RT-PCR, (B): Amplification of chickpea *ubiquitin* as internal control



شکل ۶- بررسی بیان ژن *ccl21* با استفاده از Real time PCR، A، B و C: تأیید بیان *ccl21* در نمونه‌های اینفیلتره‌شده نخود با Real time PCR؛ control: ژن *ubiqutin* به عنوان ژن کنترل داخلی

Fig. 6. *ccl21* gene expression assessment, A, B & C: Verification of *ccl21* expression in chickpea samples with Real time PCR; control: *ubiquitin* as internal control

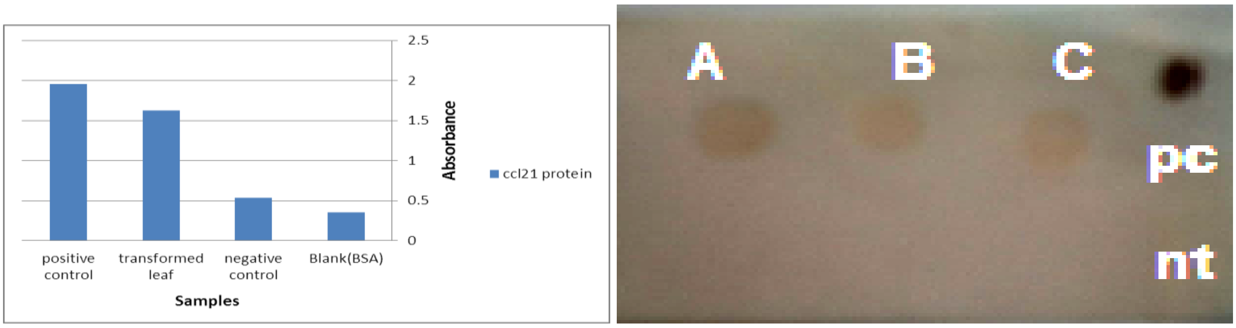
A B



شکل ۷- بررسی نمونه‌های پروتئینی استخراج‌شده از برگ‌های تلقیح‌شده نخود توسط ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد (A)، ladder: نشانگر مولکولی پروتئینی پارس توس؛ ۱، ۲ و ۳: نمونه‌های پروتئینی برگ‌های تلقیح‌شده نخود و مشاهده باند ۱۵/۵ کیلو دالتون، B: آزمون وسترن بلات نمونه‌های پروتئینی برگ‌های اینفیلتره‌شده نخود، pc: نمونه کنترل مثبت ویروس مزاییک توتون؛ ۱و ۲: نمونه‌های پروتئینی برگ‌های اینفیلتره‌شده و مشاهده باند ۱۵/۵کیلو دالتون، نشانگر مولکولی pre staine فرمنتاز

Fig. 7. 15% SDS-PAGE gel analysis of protein samples extracted from chickpea leaves (A), ladder: Protein molecular marker (Parstous); 1, 2 & 3: protein samples from chickpea leaves (15.5 KD band), Western blotting of protein samples (B), Lane 1 & 2: infiltrated protein samples, (15.5 KD band shows CCL21 molecular weight); pc: positive control mosaic virus of tobacco

B A



B A

شکل ۸- (A): تأیید تولید پروتئین نوترکیب CCL21 در برگ‌های نخود تزریق‌شده با سوسپانسیون اگروباکتریوم با استفاده از آزمون دات بلات، A, B & C: نمونه‌های پروتئینی اینفیلتره‌شده نخود؛ pc: نمونه کنترل مثبت؛ nt: نمونه کنترل منفی (گیاه غیرتراریخته)، (B): بررسی تولید پروتئین توسط آزمون الایزا، positive control: کنترل مثبت؛ transformed leaf: پروتئین گیاه تراریخته، negative control: کنترل منفی (پروتئین)

Fig. 8. (A): Protein dot blot for detection of recombinant protein in transformed leaves of chickpea A, B & C: protein sample of transgenic plants; pc: positive control; nt: protein sample of non-transgenic plant, B: Quantification of recombinant CCL21 protein in transgenic plants by ELISA; positive control; protein sample of transgenic plants; protein sample of non-transgenic plant as negative control and Blank

بررسی بیان موقت، روشی رایج جهت ارزیابی ظرفیت سلول‌های مختلف گیاهی در تولید یک پروتئین خاص یا سنجش سازه‌های بیانی مختلف است که با استفاده از تکنیک آگرواینفیلتراسیون انجام می‌شود. این روش سریع، انعطاف‌پذیر، ساده، بی‌نیاز به کشت بافت و در بافت‌های تمایزیافته قابل اجرا بوده و برای آنالیز عملکرد ژن در زمان کوتاه روش کارآمدی می‌باشد (Bendahmane *et al.*, 2000; Gidding *et al.*, 2000). با روش بیان موقت می توان توانایی سیستم بیان ژن را قبل از انتقال دائم به گیاه مورد ارزیابی قرار داد، زیرا تولید گیاه تراریخته با تظاهر دائم مستلزم صرف وقت و هزینه

است. به این ترتیب با تعیین بهترین سیستم و حذف سیستم هایی که کارآیی کمتری دارند، می‌توان در وقت و هزینه صرفه جویی کرد. همچنین از این روش می‌توان جهت بیان سریع پروتئین‌های باارزش استفاده کرد. تکنیک استفاده‌شده در این مطالعه (آگروانیفیلتراسیون) در مقایسه با دیگر سیستم‌های تعیین بیان تراریخت، دارای چندین مزیت می‌باشد؛ از جمله این‌که برخلاف ناقل‌های ویروسی با محدودیت در اندازه ژن منتقل شده مواجه نیست. انجام آن ساده‌تر از بمباران ذره‌ای و تراریختی پروتوپلاست می‌باشد. سریع است و برخلاف تراریختی پایدار اجازه می‌دهد ژن‌ها آنالیز شوند و اثر زیان آوری روی رشد و نمو نداشته باشند. مقدار بافتی که ژن در آن بیان شده به صورت موقت برای انجام آنالیز پروتئین و RNA کافی است و پتانسیل استفاده برای تولید پروتئین در مقیاس آزمایشگاهی را دارد. همچنین به وسیله این روش می‌توان برخی از پروتئین ها را بدون نیاز به باززایی گیاهان تراریخته خصوصاً در گونه‌های گیاهی از جمله حبوبات که به سختی باززایی می‌شوند، تولید کرد (Leckie & Stewart, 2011). تاکنون مطالعات زیادی بر روی نخود انجام شده است و ژن های متعددی به منظور تولید صفات مختلف در گیاه نخود از طریق اگرو اینفیلتراسیون وارد شده است (Fontana *et al.*,1993; Krishnamurthy *et al.*,2000, Shivani *et al.*,2010).

مطالعه حاضر که اولین تحقیق در زمینه تولید پروتئین CCL21 در گیاه نخود می‌باشد، با هدف استفاده از پتانسیل بالای گیاهان جهت تولید این پروتئین نوترکیب طراحی و اجرا گردید. از آنجا که در پلاسمیدها و سیستم‌های تظاهر امکان جایگزینی عناصر تنظیمی مختلف و مقایسه و بررسی آنها وجود دارد، می‌توان بهترین عناصر تنظیمی بیان ژن را جهت دستیابی به بالاترین میزان تولید پروتئین نوترکیب در گیاه شناسایی نمود. در این تحقیق نیز استفاده از عوامل مختلف افزایش‌دهنده بیانی (نظیر بهینه‌سازی توالی بر اساس ترجیح کدون گیاهی، استفاده از توالی کوزاک و پپتید راهنمای SEKDEL) توانست تأثیر زیادی در میزان بیان پروتئین داشته باشد. از این رو جهت تولید گیاهان تراریخته پایدار تولیدکننده پروتئین نوترکیب CCL21 می‌توان از این ترکیب پلاسمیدی استفاده نمود.

در این پژوهش نشان داده شد که ژن *ccl21* امکان بیان در گیاه نخود را داشته و این پروتئین نوترکیب تولیدشده با استفاده از آنتی‌بادی تگ هیستیدین کونژوگه قابل شناسایی می‌باشد. از آنجایی‌که در این بررسی، بیان ژن مورد نظر به خوبی در گیاه نخود به عنوان یک میزبان گیاهی مناسب انجام شد، چنین نتیجه‌گیری می‌شود که با بهره‌گیری از روش آگروانیفیلتراسیون می‌توان میزان نسبتاً بالایی از ژن *ccl21* را در مدت زمان اندک تولید نمود و از این پروتئین نوترکیب به عنوان فاکتوری برای تقویت سیستم ایمنی انسان به خصوص در افراد مبتلا به سرطان استفاده کرد. در ادامه پروژه با بهینه سازی روش انتقال ژن به نخود و عدس می‌توان گیاه تراریخته پایداری تولید نمود که ژن *ccl21* در آن بیان شود.

منابع

1. Bendahmane, A., Querci, M., Kanyuka, K., and Baulcombe, D.C. 2000. Agrobacterium transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the Rx2 locus in potato. The Plant Journal 21(1): 73-81.
2. Boehm, R. 2007. Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms. Annals of the New York Academy of Sciences 1102(1): 121-134.
3. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-54.
4. Ding, Y., Shimada, Y., Maeda, M., Kawabe, A., Kaganoi, J., Komoto, I., and Imamura, M. 2003. Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. Clinical Cancer Research 9(9): 3406-3412.
5. Farsad, A.S., Malekzadeh-Shafaroudi, S., Moshtaghi, N., Fotouhi, F., and Zibaee, S. 2016. Transient expression of HA1 antigen of avian influenza virus (H5N1) in alfalfa, soybean and lettuce leaves by agroinfiltration. Kerman Journal of Biotechnology 8 (1): 61-80.
6. Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., and Twyman, R. 2004. Plant based production of Biopharmaceuticals. Current Opinion in Plant Biology 7: 152-158.
7. Floss, D.M., Falkenburg, D., and Conrad, U. 2007. Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview. Transgenic Research 16(3): 315-332.
8. Gidding, G., Allison, G., Brooks, D., and Carter, A. 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. Natural Biotechnology 18: 1151-1155.

9. Gollmer, K., Asperti-Boursin, F., Tanaka, Y., Okkenhaug, K., Vanhaesebroeck, B., Peterson, J.R., Fukui, Y., Donnadieu, E., and Stein, J.V. 2009. CCL21 mediates CD4+ T-cell costimulation via a DOCK2/Rac-dependent pathway. Blood 114: 580-588.
10. Habibi-Pirkoohi, M., Malekzadeh-Shafaroudi, S., Marashi, H., Moshtaghi, N., Nassiri, M.R., and Zibaee, S. 2014. Transient expression of foot and mouth disease virus (FMDV) coat protein in tobacco (*Nicotiana tabacom*) via agroinfiltration. Iranian Journal of Biotechnology 12: 28-35.
11. Hashemi, H., Jourabchi, E., and Khodabandeh, M. 2005. Transient expression of human growth hormone in potato (*Solanum tuberosum*), tobacco (*Nicotiana tobacum*) and lettuce (*Lactuca sativa*) leaves by agroinfiltration. Iranian Journal of Biotechnology 3(2): 109.
12. Hefferon, K., Grealy, M., and Mutrie, N. 2010. Transforming from Cocoon to Butterfly: The potential role of the body in the process of posttraumatic growth. Journal of Humanistic Psychology 50(2): 224-247.
13. Hobbs, S.L.A., Jackson, J.A., and Mahon, J.D. 1989. Specificity of strain and genotype in the susceptibility of pea to *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports 8: 274-277.
14. Johnson, N., Bryant, A., Miles, T., Hogberg, T., and Cornes, P. 2011. Adjuvant Chemotherapy for Endometrial Cancer after Hysterectomy. The Cochrane Database of Systematic Reviews.
15. Kim, T.G., and Yang, M.S. 2010. Current trends in edible vaccine development using transgenic plants. Biotechnology and Bioprocess Engineering 15: 61-65.
16. Koprowski, H., and Yusibov, V. 2001. The green revolution: plants as heterologous expression vectors. Vaccine 19(17): 2735-2741.
17. Kozak, M. 1989. The scanning model for translation: an update. The Journal of Cell Biology 108(2): 229-241.
18. Leckie, B.M., and Stewart, J.C.N. 2011. Agroinfiltration as a technique for rapid assays for evaluating candidate insect resistance transgenes in plants. Plant Cell Reports 30(3): 325-334.
19. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Methods 25: 402-408.
20. Lollini, P.L., Cavallo, F., Nanni, P., and Forni, G. 2006. Vaccines for tumour prevention. Nature Reviews Cancer 6(3): 204-16.
21. Lu, L.L., Chen, X.H., Zhang, G., Liu, Z.C., Wu, N., Wang, H., Qi, Y.F., Wang, H.S., Cai, S.H., and Du, J. 2016. CCL21 Facilitates Chemoresistance and Cancer Stem Cell-Like Properties of Colorectal Cancer Cells through AKT/GSK-3β/Snail Signals. Oxidative Medicine and Cellular Longevity.
22. Mantovani, A., Bonecchi, R., and Locati, M. 2006. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. Nature Reviews Immunology 6(12): 907-918.
23. Mehrotra M, Sanyal, I., Amla, D.V. 2011. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and regeneration of insect-resistant transgenic plants. Plant Cell Reports 30: 1603-1616.
24. Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N.F., Catron, D., Buchanan, M.E., and Wagner, S.N. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature 410(6824): 50-56.
25. Nie, L., Wu, G., and Zhang, W. 2006. Correlation between mRNA and protein abundance in *Desulfovibrio vulgaris*: a multiple regression to identify sources of variations. Biochemical and Biophysical Research Communications 339: 603-610.
26. Obembe, O.O., Popoola, J.O., Leelavathi, S., and Reddy, S.V. 2011. Advances in plant molecular farming. Biotechnology Advances 29: 210-222.
27. Sain, M., and Sharma, V. 2013. Catharanthus roseus (An anti-cancerous drug yielding plant)- A review of potential Therapeutic properties. International Journal of Pure & Applied Bioscience 1(6): 139-142.
28. Shivani I., Hari, S.M., and Susan, E., 2010. *Agrobacteriium*-mediated transformation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) with an insecticidal protein gene: optimisation of different factors. Physiol Molecular Biology Plants 16(3): 273-284.
29. Shoji, Y., Bi, H., Musiychuk, K., Rhee, A., Horsey, A., and Roy, G. 2009. Plant-derived hemagglutinin protects ferrets against challenge infection with the A/Indonesia/05/05 strain of avian influenza. Vaccine 27: 1087-1092.
30. Simmons, C.W., VanderGheynst, J.S., and Upadhyaya, S.K. 2009. A model of *Agrobacterium tumefaciens* vacuum infiltration into harvested leaf tissue and subsequent in planta transgene transient expression. Biotechnology and Bioengineering 102(3): 965-970.
31. Wandeltt, C., Rafiqul, M., Khan, S.C., Harmut, E.S., Spencer, D., and Higgins, T.J.V. 1992. Vicilin with carboxyterminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. Plant Journal 2: 181-192.

32. Wang, X.Q. 2004. 5-Untranslated regions with multiple upstream AUG codons can support low-level translation via leaky scanning and reinitiation. Nucleic Acids Research 32: 1382-1391.
33. Wang, A., and Ma, S. 2012. Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects. Springer 183-198.
34. Wang, J., Seethala, R.R., Zhang, Q., Gooding, W., Van Waes, C., Hasegawa, H., and Ferris, R.L. 2008. Autocrine and paracrine chemokine receptor 7 activation in head and neck cancer: implications for therapy. Journal of the National Cancer Institute 100 (7): 502-512.
35. Watson, M., Benard, V., Thomas, C., Brayboy, A., Paisano, R., and Becker, T. 2014. Cervical cancer incidence and mortality among American Indian and Alaska Native women, 1999-2009. American Journal of Public Health 104 (3): S415-22.
36. Ware, M. 2016. Chickpeas: Health Benefits, Nutritional Information. Available at Web site http://www.medicalnewstoday.com.
37. Wroblewski, T., Tomczak, A., and Michelmore, R. 2005. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. Plant Biotechnology Journal 3(2): 259-273.
38. Yajun, F., Wei, L., Xiaojuan, Z., and Xingzhi, W. 2012. Transient expression of acidic fibroblast growth factor in pea (*Pisum sativum* L.) plants. African Journal of Biotechnology 11(22): 6060-6063.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 10, No. 1, 2019, p. 91-102 (Research Article)

Transient expression of CCL21 chemokine in chickpea via agroinfiltration

Beihaghi[1], M., Bagheri[2*], A., Marashi[3], H., Sankian[4], M. & Farsad[5], A.S.

1. Member of Science (Assistant Professor), Department of Biology, Kavian Institute of Higher Education, Mashhad, Iran, mariabeihaghi@kavian.ac.ir
2. Professor, Department of Biotechnology, College of Agriculture & Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
3. Professor, Department of Biotechnology, College of Agriculture marashi@um.ac.ir, Ferdowsi University of Mashhad, Iran, marashi@um.ac.ir
4. BuAli Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran, sankianm@mums.ac.ir
5. Contribution from College of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran, farsadafsaneh@yahoo.com

Received: 13 November 2016
Accepted: 5 July 2017

DOI: 10.22067/ijpr.v10i1.60228

Introduction

Chemokine (C-C motif) ligand 21 (CCL21) has anti-tumor efficacy and used for immunotherapy based on cytokinins against cancer cells. Immune potentiating of CCL21 chemokine via DC and stromal cell-based approaches for effective recruitment and activation of APC and T cells for promotion of antitumor activity in lung cancer was evaluated. Plants are now gaining widespread acceptance as a general platform and as bioreactors for the large scale production of recombinant proteins. However, the technique suffers from major drawbacks such as low expression level and long time required for the production of the recombinant protein in plant tissues. The goal of the present study was to investigate the possibility of expressing the CCL21 protein in *Cicer arietinum* via agroinfiltration. In agroinfiltration, the suspension of *Agrobacterium tumefaciens* harboring the gene(s) of interest is infiltrated into plant leaves using a needle-free syringe. This technique has been carried out in a variety of plants with different experimental purposes and it was simple, cost effective and rapid procedure. Chickpea contain several minerals and phytochemicals components for human health, for example it has selenium, that plays essential roles in liver enzyme function, and helps detoxify some cancer-causing compounds in the body, Also selenium prevents inflammation and also decreases tumor growth rates. So cheakpea known as a valuable plant for the production of recombinant proteins chickpeas also contains folate, which plays a role in DNA synthesis and repair, thus preventing the formation of cancer cells from mutations in the DNA. Also it has saponins, which are phytochemicals that prevent cancer cells from multiplying and spreading throughout the body. High-fiber intakes from fruits and vegetables like chickpeas are associated with a lowered risk of colorectal cancer. Therefore, in this study, *ccl21* gene of human was synthesized and transiently expressed in *Cicer arietinum*.

Materials & Methods

To examine the possibility of expressing the CCL21 protein in *Cicer arietinum*, a cDNA fragment encoding the *ccl21* gene was synthesized de novo, modified with a Kozak sequence, a C-terminal hexa-histidine (6His) tag, and an endoplasmic retention signal (SEKDEL). The construct was subcloned into vector pBI121 and Agrobacterium colonies were verificated by PCR test. The resulting *ccl21* plasmid was agro-infiltrated into *Cicer arietinum*. The relative gene expression of recombinant plant-produced *ccl21* was measured by semi quantitatve RT-PCR and quantitative real-time PCR. Guided by the gene expression profile, CCL21 protein was extracted after 72 hours. A recombinant CCL21 protein was immunogenically detected by conjugated polyhistidine antibody in western blot, dot blot and ELISA assay.

***Corresponding Author:** abagheri@ferdowsi.um.ac.ir

Results & Discussion

The results of PCR assay confirmed presence of the synthetic construct in *Agrobacterium* clones. Also PCR test showed that, this construct was integrated in infiltrated leaves but the gene of interest is not integrated in the nuclear genome of plant cell. So, the transgene in plant tissue is higher than pure plasmid as control. RT- PCR and Real time PCR assay was also conducted to evaluate the expression of gene. Dot blot assay showed that, the protein sample obtained from transformed leaves generated a strong signal which is comparable to that of positive control, whereas wild type plant protein was not detectable. Also enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blot showed that gene construt of *ccl21* was expressed highly in transcription and translation level. Migration size of protein was detected at 15.5 KD by Western blotting. ELISA results showed that the CCL21 was expressed in the transfected leaves in high level.

Conclusion

This paper is the first research about the transient expression of the chickpea-made CCL21 protein where a synthetic sequence was used for its expression. Here, the efficacy of agroinfiltration for expression of *ccl21* gene in chickpea was illustrated. Agroinfiltration expedites the process of recombinant protein expression in plant tissues. Therefore, using agro-infiltration system in chickpea plant was the appropriate strategy for *ccl21* gene production in the assayed plants. Therefore, this method makes it possible to evaluate efficacy of a potential recombinant vaccine in a short time.

Keywords: Agro-infiltration, C-C chemokine ligand 21 (CCL21), Chickpea, Transient gene expression